

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00421

## 玻璃化冷冻兔卵巢组织自体移植后卵巢功能观察

于璇, 邓晓惠\*, 晁岚, 于红玲

山东大学齐鲁医院不孕不育诊疗中心, 济南 200512

**[摘要]** **目的** 观察玻璃化冷冻兔卵巢组织自体子宫系膜内种植后卵泡的发育情况。**方法** 15只新西兰白兔随机分为两组:(1)冷冻复苏移植组,10只,切除双侧卵巢,将卵巢切成小组织块玻璃化冷冻2周后复苏,多点自体种植于子宫系膜内;(2)对照组,5只。通过卵巢组织光镜、阴道脱落细胞学检查,观察种植后卵巢组织长期存活、卵泡生长发育及内分泌功能恢复及维持情况;观察存活的卵巢组织对促性腺激素的反应性;采集MⅡ期成熟卵进行卵胞浆内单精子注射(intracytoplasmic sperm injection, ICSI),进一步观察移植后发育成熟的卵母细胞的受精情况。**结果** 移植2个月和6个月后卵巢组织中各级卵泡所占的比例与正常卵巢组织相比差异无统计学意义( $P>0.05$ );移植半年后对卵巢组织应用卵泡刺激素,与未用卵泡刺激素的卵巢组织相比,近成熟卵泡所占的比例增多( $P<0.05$ );成熟卵母细胞ICSI受精后,能够得到正常的胚胎。**结论** 玻璃化冷冻兔卵巢组织自体子宫系膜内种植能够很好地恢复卵巢功能,其功能可维持较长时间,结合体外受精技术可以产生正常的胚胎。

**[关键词]** 卵巢;自体移植;低温保存

**[中图分类号]** R 711

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2012)04-0421-04

### Observation of ovarian function after autologous implantation of vitrified ovarian tissues in female rabbits

YU Xuan, DENG Xiao-hui\*, CHAO Lan, YU Hong-ling

Reproduction Medicine Center, Qilu Hospital, Shandong University, Jinan 250012, Shandong, China

**[Abstract]** **Objective** To observe the follicle growth of vitrified rabbit ovarian tissues after autologous implantation in mesometrium in rabbits. **Methods** Fifteen female New Zealand rabbits were randomly divided into two groups. (1) Vitrified ovarian tissue group ( $n=10$ ): rabbits were bilaterally ovariectomized and the ovary was made into small tissues for vitrified freezing; two weeks later the frozen-thawed ovarian tissues were autologously transplanted into the mesometrium. (2) Control group included 5 animals. The long-term survival of ovarian tissues, survival and development of follicles, and endocrine function after gonadotropin treatment were evaluated by light microscope and vaginal exfoliocytopology. The response of cryopreserved ovarian tissues to gonadotrophin was observed after autologous implantation. The oocytes of MⅡ stage were subjected to intracytoplasmic sperm injection (ICSI) to further observe the development potency of oocytes after autologous implantation. **Results** The ratios of follicles of each stage 2 months and 6 months after transplantation were similar to those of control group ( $P>0.05$ ). Six months after follicle-stimulating hormone (FSH) stimulation, the ratio of mature follicles in ovarian tissues was significantly higher than that in the group untreated with FSH ( $P<0.05$ ). The oocytes derived from ovarian tissues after superovulation could obtain normal embryos by ICSI. **Conclusion** Vitrified rabbit ovarian tissues can achieve ovarian function after autologous implantation in mesometrium, and the function can maintain for a long period; furthermore, normal embryos can be obtained by ICSI technique.

**[Key words]** ovary; autologous transplantation; cryopreservation

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(4): 421-424]

大剂量的放化疗后会对女性癌症患者的卵巢造成不可逆的损伤,因此在进行放疗或化疗前行手术将卵巢取出后进行冷冻保存,待癌症缓解后选择适当时机进行卵巢组织自体移植术,对保存和恢复患者的卵巢功能有很大的临床价值。人类卵巢组织的

冷冻保存及移植已取得了一定的进展<sup>[1-2]</sup>,因受到伦理等问题的限制尚缺乏系统的研究。卵巢组织冻存移植的目标在于不断改进冻存移植技术使移植后获得尽可能多的存活卵泡,更利于移植后卵巢组织功能的恢复及长期维持。玻璃化冷冻方法简单、快捷,

**[收稿日期]** 2012-01-06

**[接受日期]** 2012-03-19

**[基金项目]** 山东省教育厅基金(2010GSF10814)。Supported by Research Fund of the Education Department of Shandong Province (2010GSF10814)。

**[作者简介]** 于璇, 硕士。E-mail: gc2000\_80@163.com

\* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 0531-82169295, E-mail: dxh122@yahoo.cn

可减少冰晶形成所致的细胞损伤<sup>[3]</sup>。本实验通过观察玻璃化冷冻兔卵巢组织种植于子宫系膜后卵泡生长发育情况,探讨玻璃化冷冻卵巢组织自体移植恢复卵巢内分泌及生殖功能的可行性,为人类卵巢组织冷冻移植研究提供实验依据。

## 1 材料和方法

1.1 实验动物及分组 选取健康性成熟新西兰雌兔,8~12个月龄,体质量2.5~3.0 kg,由山东省农业科学院提供。动物入室适应环境1周后,采用连续阴道脱落上皮细胞涂片的方法观察动情周期,选择动情周期正常的兔子15只,随机分为两组:(1)冷冻复苏移植组(10只),切除双侧卵巢,将卵巢切成小组织块玻璃化冷冻2周后复苏,多点自体种植于子宫系膜内;(2)对照组(5只)。

### 1.2 卵巢组织冷冻、移植

1.2.1 卵巢组织的获取 将3%的戊巴比妥钠溶液以1 ml/kg体质量耳缘静脉注射麻醉兔后,行下腹正中切口切除双侧卵巢,对照组行下腹正中切口后直接缝合。切除的卵巢组织于室温下用磷酸盐缓冲液(PBS,美国Sigma公司)洗涤10次,切成大小约为1 mm<sup>3</sup>的组织块,用玻璃化冷冻方法进行冷冻。

1.2.2 卵巢组织冷冻保存及复苏 本实验参照文献<sup>[4]</sup>的玻璃化冷冻方法进行。冷冻保护剂包括平衡液和冷冻保护液。平衡液:7.5%乙二醇+7.5%二甲亚砷+20%胎牛血清+TCM-199;冷冻保护液:15%乙二醇+15%二甲亚砷+20%胎牛血清+0.5 mol/L蔗糖+TCM-199。冻融方法:将卵巢组织放入平衡液中,室温下平衡15 min,然后移入保护液中4℃继续渗透平衡30 min。渗透完成后将组织连同冷冻保护剂装入0.5 ml麦管中,投入液氮中保存2周。复苏组织时,将麦管室温放置30 s,然后依次放入含1 mol/L蔗糖及20%胎牛血清的TCM-199中,并室温下渗透10 min,将组织移入含20%胎牛血清的TCM-199中待移植。以上所用试剂均购于美国Sigma公司。

1.2.3 卵巢组织移植 麻醉动物后,腹部备皮消毒,采用下腹正中切口,将复苏后的卵巢组织自体多点植入兔子宫系膜内,用丝线标记种植部位,整个过程在1 h内完成。首次手术后第3天起,每日进行阴道脱落细胞涂片,以动情周期的恢复来确定移植后卵巢组织存活情况。

1.2.4 移植后卵巢组织的获取 分别在移植后2个月(3只)和6个月(7只)处死实验兔,取移植后卵巢组织进行组织学观察。应用卵泡刺激素的实验兔(6个月,4只)在取组织前用皮下注射卵泡刺激素(FSH,中国科学院动物研究所)超促排卵,15 U/次,

每天2次,连续3 d,最后一次注射后,由耳缘静脉注射绒毛膜促性腺激素(HCG,丽珠医药集团有限公司)100 U,13 h后将兔处死,观察记录双侧子宫系膜内移植卵巢组织的大小、血供情况,并取移植后的卵巢组织行组织学观察。

1.3 卵母细胞的采集及受精 取促排卵后的卵巢组织置于含10%胎牛血清的TCM-199中,用注射针挑破卵泡并轻压,使带有卵丘细胞和颗粒细胞的卵母细胞外逸,经 $5 \times 10^5$  IU/L透明质酸酶处理去除卵丘细胞,在倒置显微镜下观察卵子大小和透明带的厚度。根据卵母细胞的成熟度分为两组:成熟卵组为有第一极体MⅡ期卵;未成熟卵组包括既无生发泡也无第一极体的MⅠ期卵和有生发泡但无第一极体的GV期卵。选择具有第一极体的成熟卵子进行卵泡浆内单精子注射(ICSI)受精,注射针内径为5 μm。采用离体法获得精液,用BWW上游法使其获能,调整精子密度为 $1 \times 10^6$ 个/ml。受精卵置于含有1.25 mmol/L丙酮酸钠、0.1 mmol/L EDTA和10%胎牛血清的TCM-199微滴中进行培养,隔天半量换液,观察受精及胚胎发育情况。

### 1.4 观察指标

1.4.1 阴道脱落细胞学观察 冻融移植后3 d起,每日同一时间进行阴道上皮细胞涂片,巴氏染色后光镜下观察阴道脱落细胞形态的周期性变化来判断兔卵巢组织存活及功能恢复情况。动情初期,脱落细胞以中层细胞为主,少量角化细胞;动情中期,脱落细胞以表层角化细胞为主;动情后期,脱落细胞以表层角化细胞、中层细胞为主,偶见底层细胞;动情间期,脱落细胞以中层及底层细胞为主。

1.4.2 组织学观察 卵巢组织经10%甲醛溶液固定后,石蜡包埋,3 μm厚切片,行H-E染色,光镜下观察卵巢结构,计数各级卵泡数。分类标准:原始卵泡由初级卵母细胞及其周围的单层梭形颗粒细胞组成;窦前卵泡分为初级卵泡与次级卵泡,初级卵泡周围为单层立方颗粒细胞,次级卵泡周围围绕多层立方颗粒细胞;窦状卵泡产生卵泡液形成卵泡腔;近成熟卵泡,卵泡腔明显增大,卵泡液增多,卵泡移行向卵巢表面凸起。

1.5 统计学处理 应用SPSS 14.0软件进行统计学分析,各样本率的比较采用 $\chi^2$ 检验,检验水平( $\alpha$ )为0.05。

## 2 结果

2.1 各移植组动情周期的恢复情况 冷冻复苏移植兔在移植术后14~21 d内阴道脱落细胞开始出现规律的周期性变化,此后动情周期规律出现,移植后

半年动情周期仍规律,证明移植后卵巢组织卵泡发育和激素分泌功能正常并能长期维持。见图 1A。

2.2 移植后卵巢组织的存活及组织形态 移植组子宫系膜内均可见存活的卵巢组织,存活的卵巢组织表面可见清晰的毛细血管网,皮质内见大量各级卵泡。移植存活卵巢组织内的绝大部分卵泡结构形态正常,但也有较多形态异常的卵泡存在。

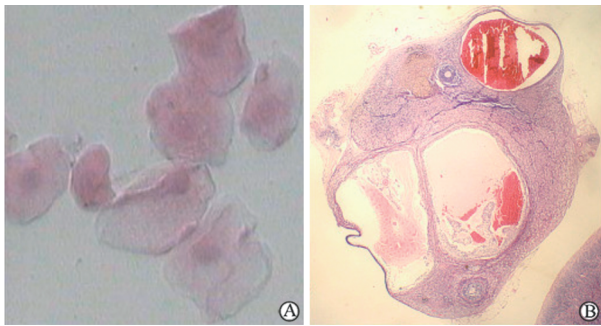


图 1 阴道脱落细胞检查和冻存卵巢组织子宫系膜内种植后观察

Fig 1 Exfoliation of vaginal cells and ovarian tissue implanted in mesometrium

A: Exfoliation of vaginal cells was mainly superficial cells; B: Ovarian tissue implanted in mesometrium resulted in morphologically normal mature follicle. Original magnification:  $\times 200$  (A),  $\times 40$  (B)

移植后 6 个月,卵巢组织结构仍正常,皮质内可见大量的原始卵泡及初级卵泡,并可见近成熟卵泡。组织学显示,应用卵泡刺激素的移植卵巢组织内近成熟卵泡数量明显增多,可见近成熟卵泡突向卵巢组织表面,卵泡腔明显增大,其内见卵泡液,卵细胞清晰,卵丘细胞排列规则,基底膜完整(图 1B)。

2.3 移植后卵巢组织内卵泡发育情况 移植 2 个月和 6 个月后卵巢组织中各级卵泡所占的比例与正常卵巢组织相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),说明经过移植后的卵巢组织能够存活较长一段时间,并且其中的各级卵泡发育良好。移植 6 个月后对卵巢组织应用卵泡刺激素,与未用卵泡刺激素的卵巢组织相比,近成熟卵泡所占的比例明显增多( $P < 0.05$ ),说明促性腺激素的应用能够促进移植后卵巢组织中卵泡的发育。见表 1。

采集超促排卵后有第一极体 M II 期成熟卵进行 ICSI 受精,进一步观察移植后发育成熟的卵母细胞的受精情况及受精卵的发育潜能。结果显示,受精卵卵裂正常,能够顺利分裂到 8 细胞并进一步发育,说明兔卵巢组织冷冻移植后卵母细胞能够正常发育,结合体外受精技术可以产生正常的胚胎,恢复生殖功能。见图 2。

表 1 移植后各级卵泡发育比例

Tab 1 Ratios of follicles of different stages after transplantation

Group	N	n(%)			
		Primordial follicle	Primary follicle	Secondary follicle	Maturescent follicle
Control	471	347(73.7)	91(19.3)	23(4.9)	10(2.1)
Two months after transplantation	359	249(69.3)	72(20.1)	29(8.1)	9(2.5)
Six months after transplantation	421	294(69.8)	87(20.7)	32(7.6)	8(1.9)*
Six months of stimulus with FSH	394	268(68.0)	77(19.5)	24(6.1)	25(6.4)

The control group follicles were from five rabbits, two months after transplantation group follicles from three rabbits, six months after transplantation group follicles from three rabbits, six months of stimulus with FSH group follicles from four rabbits. FSH: Follicle-stimulating hormone. \*  $P < 0.05$  vs six months of stimulus with FSH group

### 3 讨论

卵泡是不可再生组织,女性癌症患者因放疗、化疗等原因导致的卵泡丢失会造成卵巢功能丧失。近年发展迅速的卵巢组织冻存移植技术为这一部分患者带来了保存并重获卵巢功能的希望——放化疗前将卵巢组织冷冻保存,待癌症缓解后进行移植可以帮助患者恢复卵巢功能。冻存移植后卵巢内分泌及生育能力的恢复及长期维持是此项技术所要达到的目标。本实验旨在探讨移植后卵巢组织的长期存活、卵巢功能储备及卵泡发育能力。

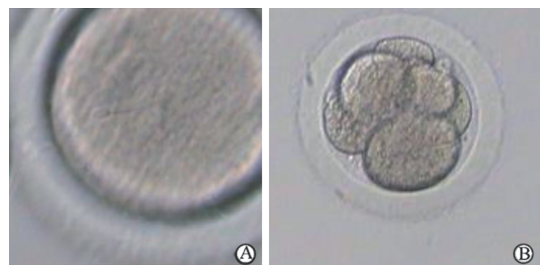


图 2 兔卵母细胞 ICSI(A)及正常卵裂的 8 细胞胚胎(B)  
Fig 2 Rabbit oocyte after ICSI (A) and normal eight-cell embryo (B)

ICSI: Intracytoplasmic sperm injection. Original magnification:  $\times 400$  (A),  $\times 200$  (B)

玻璃化冷冻技术能够很好地保存卵巢组织<sup>[3-4]</sup>, 卵巢组织移植后能观察到卵泡发育及排卵后黄体<sup>[5]</sup>。玻璃化冷冻方法具有降温速度快、冰晶形成少、操作简单和费用低等优点,因此本实验中我们采用玻璃化冷冻方法冻存卵巢组织。我们前期研究证实,小块卵巢组织冷冻可以获得良好的冷冻保存效果,且冷冻卵巢组织子宫系膜、卵巢囊种植和卵巢皮质内自体多点种植后,卵巢组织形态学无明显改变,卵泡存活并正常发育<sup>[6]</sup>。我们将玻璃化冷冻复苏后的兔卵巢组织自体多点种植于子宫系膜内,阴道脱落细胞学检查证实确实有卵巢组织存活后,将移植兔长期饲养以观察移植后卵巢组织功能的维持及卵泡发育情况。卵巢组织冻存移植后可得到较高的卵泡存活率,卵泡发育情况可直接反映卵巢功能的恢复,而卵泡存活率及数量直接影响到卵巢组织功能维持的时间。在本实验中我们观察到,移植半年后,卵巢组织内仍有大量的各级卵泡,卵泡发育良好,对卵巢组织应用卵泡刺激素有大量卵泡发育成熟。Salle等<sup>[7]</sup>报道将羊卵巢冻存移植后4周孕激素水平升高,恢复了性激素的周期性分泌。阴道脱落细胞受卵泡分泌雌激素的作用出现周期性变化,我们通过阴道脱落细胞学检查也证实卵巢组织移植后长时间内激素分泌正常,脱落细胞出现周期性变化。

卵巢组织冻存移植技术的研究有望使那些因癌症放、化疗而失去卵巢功能的患者重获生育能力。Donnez等<sup>[1]</sup>报道了首例女性在癌症治疗后经自体原位移植冻存卵巢组织成功受孕,并最终分娩一活婴的病例。从理论上讲,一年的时间足够用于获得成熟的卵母细胞进行体外受精-胚胎移植(IVF-ET),Rosendahl等<sup>[8]</sup>报道将一位28岁患有霍奇金淋巴瘤妇女的卵巢皮质在放化疗前冻存,待患者肿瘤完全缓解后,将卵巢组织融解后移植收集卵泡行ICSI,胚胎移植后14d,生化检测证实妊娠,但是未获得临床妊娠。在本实验中我们也收集了一部分成熟卵母细胞进行ICSI受精,进一步观察经移植后发育成熟的卵母细胞的受精情况及受精卵的发育潜能,结果显示玻璃化冷冻卵巢组织-子宫系膜内种植能够获得健康成熟的卵母细胞,进行体外受精后受精卵发育正常,为卵巢组织冻存移植恢复患者生育能力提供了实验依据。

卵巢组织冻存移植后功能的长期维持是目前此项技术研究的焦点和难点。目前关于移植后卵巢组织功能维持时间长短的报道不一。Baird等<sup>[9]</sup>对羊卵巢组织冻存移植后存活情况进行长期观察发现,卵巢功能维持了近一年。Oktay等<sup>[10]</sup>将新鲜卵巢组织植入患者前臂皮下,16个月后血清激素检查证实卵巢功能开始衰退。我们在卵巢组织移植半年后将

卵巢组织取出进行组织学观察发现,卵巢皮质内有大量的原始卵泡,各级卵泡发育良好,这都证明卵巢组织的功能还能维持较长一段时间。冻融后卵巢组织移植,在冷冻、复苏及移植过程中卵泡大量丢失,这决定了移植后卵巢功能随着卵巢内卵泡的耗竭会维持一段时间后消失。因此在冻存移植过程中许多影响卵巢组织长期功能的因素还有待进一步研究,如何更好、更长时间地维持移植后卵巢组织的功能是日后研究的焦点。

综上所述,玻璃化冷冻卵巢组织自体子宫系膜内种植能够很好地恢复卵巢功能并维持较长一段时间,应用促性腺激素能够促进卵泡的成熟,成熟卵母细胞体外受精后受精卵发育良好。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] Donnez J, Dolmans M M, Demylle D, Jadoul P, Pirard C, Squifflet J, et al. Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue[J]. *Lancet*, 2004, 364: 1405-1410.
- [2] Meirow D, Levron J, Eldar-Geva T, Hardan I, Fridman E, Zalel Y, et al. Pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue in a patient with ovarian failure after chemotherapy [J]. *N Engl J Med*, 2005, 353: 318-321.
- [3] Yeoman R R, Wolf D P, Lee D M. Coculture of monkey ovarian tissue increases survival after vitrification and slow-rate freezing[J]. *Fertil Steril*, 2005, 83(Suppl 1): 1248-1254.
- [4] Hasegawa A, Mochida N, Ogasawara T, Koyama K. Pup birth from mouse oocytes in preantral follicles derived from vitrified and warmed ovaries followed by *in vitro* growth, *in vitro* maturation, and *in vitro* fertilization[J]. *Fertil Steril*, 2006, 86(4 Suppl): 1182-1192.
- [5] 刘春玲, 许培箴, 王秋伟, 虞斌, 丁家桐. 母兔卵巢异位移植的实验研究[J]. *现代妇产科进展*, 2009, 5: 337-339.
- [6] Deng X H, Xu A R, Chao L, Yu H L, Zhen J H, Hashimoto S, et al. Effect of different sites for cryopreserved ovarian tissue implantation in rabbit[J]. *Hum Reprod*, 2007, 22: 662-668.
- [7] Salle B, Lornage J, Demirci B, Vaudoyer F, Poirel M T, Franck M, et al. Restoration of ovarian steroid secretion and histologic assessment after freezing, thawing, and autograft of a hemi-ovary in sheep[J]. *Fertil Steril*, 1999, 72: 366-370.
- [8] Rosendahl M, Loft A, Byskov A G, Ziebe S, Schmidt K T, Andersen A N, et al. Biochemical pregnancy after fertilization of an oocyte aspirated from a heterotopic autotransplant of cryopreserved ovarian tissue; case report[J]. *Hum Reprod*, 2006, 21: 2006-2009.
- [9] Baird D T, Webb R, Campbell B K, Harkness L M, Gosden R G. Long-term ovarian function in sheep after ovariectomy and transplantation of autografts stored at  $-196^{\circ}\text{C}$  [J]. *Endocrinology*, 1999, 140: 462-471.
- [10] Oktay K, Buyuk E, Rosenwaks Z, Rucinski J. A technique for transplantation of ovarian cortical strips to the forearm[J]. *Fertil Steril*, 2003, 80: 193-198.

[本文编辑] 商素芳